

Otimização do método de Elisa indireto não-competitivo para detecção e quantificação de aflatoxina B₁ em cereais

César Henrique Lúcio¹,
Nícésio Filadelfio J. Pinto²,
Ivanildo Evódio Marriel²

Introdução

As aflatoxinas são uma das classes de micotoxinas que ocorrem naturalmente em commodities agrícolas. Verifica-se maior ocorrência de aflatoxinas em produto vegetal oriundo de debulha manual, principalmente quando ensacado e armazenado com umidade elevada ou quando o produto é reumedecido posteriormente à sua secagem. Essa toxina pode ser encontrada em diversos produtos, como amendoim, milho, sementes oleaginosas, nozes, trigo e feijão. Estudos sobre a ocorrência de aflatoxinas em diferentes produtos mostram que o amendoim, o milho e a semente de algodão são os mais suscetíveis à contaminação (FONSECA 1984, JELINEK 1988). O problema das aflatoxinas não pode ser desconsiderado,

já que os cereais tornaram-se importantes para o agronegócio brasileiro principalmente em razão de seu papel como ingrediente na agroindústria de rações para suínos e aves, que contribuem de modo significativo para a pauta de exportação brasileira.

As aflatoxinas também já foram detectadas em ovos, leite, produtos lácteos, carne e derivados, além de em alimentos industrializados. O primeiro resíduo de aflatoxina observado no tecido de vacas e o mais intensamente estudado foi o de aflatoxina M₁ encontrada no leite. Mas ela também é encontrada, invariavelmente, no tecido animal, nas excretas e no leite e seus derivados (MARTINS, 1986).

As micotoxinas são um grupo de metabólitos secundários quimicamente diverso,

¹Nutricionista, Pós-graduado em Microbiologia

²Eng. Agr., DSc Ciências Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro. Embrapa Milho e Sorgo. Cx. P. 151. CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG.

³Eng. Agr., DSc Solos e Nutrição de Plantas. Embrapa Milho e Sorgo. Cx.P. 151. CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG. imarriel@cnpmis.embrapa.br

produzidos por diferentes espécies de fungos, principalmente dos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium*. As micotoxinas mais comumente encontradas são aflatoxinas, ochatoxina A, fumosinas, tricotecenos e zearalenonas (CHEEKE & SHULL, 1985; GILBERT & VARGAS, 2003). Essas substâncias produzem uma ampla gama de efeitos tóxicos e adversos às saúdes animal e humana (CAST, 2003). Em suínos, a intoxicação com aflatoxinas resulta em perda de peso, em redução da conversão alimentar e em imunodepressão (MALLMANN et al., 1994; SANTOS et al., 1986). Já em aves os efeitos geralmente são menor ganho de peso e de consumo de ração e menor produção e peso dos ovos. Essas circunstâncias podem resultar em morte dos animais, ocasionando grandes perdas econômicas para o agronegócio e riscos para a saúde humana (CALDAS et al., 2002).

Entre os 18 tipos diferentes de aflatoxinas produzidas na natureza, a B₁ (AFB₁) é considerada a de maior toxicidade, sendo produzida principalmente por *Aspergillus flavus*, *A. niger* e *A. parasiticus* (SMITH & ROSS, 1991; DUTON, 1988). Os alimentos e ingredientes utilizados nas dietas dos animais são contaminados com aflatoxinas nos três estágios de preparação do grão: durante o desenvolvimento da planta, ou seja, antes da colheita; entre o período de colheita e secagem; e durante o período de armazenamento (WILLIAM, 1991; PRADO et al., 1995).

Atualmente, existem normas regulatórias para as principais micotoxinas em pelo menos 100 países. Na maioria dos casos, as aflatoxinas estão incluídas, mas os níveis de tolerância máxima são bastante variáveis (EGMOND & JONKER, 2003). Zheng et al., (2006) citam que, nos Estados Unidos, os alimentos em geral devem apresentar valores máximos de 20 µg kg⁻¹, enquanto para os componentes de ração esses valores variam de 100 a 300 µg kg⁻¹, dependendo do produto, da finalidade e da idade de animais. No Brasil, de acor-

do com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento e o Ministério da Saúde, o limite de tolerância varia entre 20 e 30 µg kg⁻¹ para aflatoxinas totais em alimentos e matéria-prima para rações, respectivamente. Portanto, torna-se necessário o monitoramento da presença de AFB₁ para garantir a eficácia das medidas de segurança alimentar, do alcance de metas logísticas e operacionais das indústrias e da circulação rápida de *commodities* e produtos através dos mercados, economizando tempo e custo (SCANLAN, 2005).

Os métodos analíticos convencionais para micotoxinas incluem cromatografia de camada fina, cromatografia líquida de alta resolução e cromatografia gasosa (GILBERT & VARGAS, 2003; ZHENG et al., 2006). Contudo, em razão de extensivas etapas na preparação das amostras antes da análise, algumas vezes torna-se limitada sua aplicação prática. Como alternativas, têm sido utilizados métodos imunoquímicos, considerados rápidos e baratos. Dentre esses métodos, a técnica Elisa (*enzyme – linked immunosorbent assay*), que inclui testes diversos, tem sido utilizada por mais de uma década em análises de micotoxinas (CHU, 1996), principalmente em testes competitivos (RAMARISHMA & MEHAN, 1993). Esta tecnologia baseia-se na habilidade de um anticorpo específico para distinguir a estrutura tridimensional de uma micotoxina específica.

Como vantagens, os testes baseados na técnica Elisa podem ser quantitativos, simples, específicos, sensíveis e requerem pequenos volumes de amostras. Além disso, exigem procedimentos simples de extração se comparados aos métodos analíticos convencionais, permitindo processamento de um grande número de amostras em tempo relativamente curto.

Objetivos

- Adaptar e avaliar o teste Elisa indireto não competitivo para detecção e quantificação de aflatoxina B₁ em cereais.
- Avaliar a influência do tipo de grão sobre a biossíntese de aflatoxina B₁.

Materiais e Métodos

Os bioensaios foram conduzidos no Laboratório de Microbiologia e Bioquímica do Solo e de Fitopatologia da Embrapa Milho e Sorgo, em Sete Lagoas, Minas Gerais.

Cultura de *Aspergillus flavus* em grãos e em meio de cultura

O isolado de *Aspergillus flavus*, identificado e cedido pelo Laboratório de Fitopatologia, foi cultivado em meio ágar-batata durante 10 dias à temperatura ambiente. A partir das placas, foi preparada uma suspensão de micélios e esporos em tampão fosfato para inoculação dos seguintes tratamentos (três tipos de grãos): milho, sorgo e arroz e um adicional, (meio de cultura). Cinco mL desta suspensão foram utilizados para inocular 150g de grãos de milho, 150 g de sorgo e 150 g de arroz, previamente desinfestados com cloramina T 1%, contidos em erlenmeyers de 500 mL. No caso do tratamento adicional, meio de cultura, 50mL de caldo tripticaseína de soja, em erlenmeyers de 125mL, foram inoculados com 1mL da suspensão de fungos. Em ambos os casos, utilizaram-se três repetições.

Preparação dos extratos

Após 12 dias de incubação dos erlenmeyers na câmara de crescimento do Laboratório de Fitopatologia à temperatura aproximada de 22 graus centígrados, uma amostra de 10g de grãos de cada tratamento (milho, arroz e sorgo) foi triturada em cadinhos de porcelana, em 50mL de metanol 70% e KCl 0,5%.

No caso do meio, utilizaram-se 10mL da cultura enriquecida para 50mL na mesma solução de extração. Em seguida, as suspensões foram centrifugadas a 6000 x g durante 6 minutos e filtradas em papel *watman*, nº4. O sobrenadante foi mantido a -18°C e foram analisadas quatro repetições de cada amostra.

Elisa indireto não-competitivo

Basicamente as placas Elisa, contendo 100µL de cada extrato (ou solução de *aflatoxina* pura) por cavidade, foram incubadas durante a noite a 37°C. No dia seguinte, as placas foram lavadas 3 vezes com *Phosphate Buffered Saline Tween* (PBS-T) e tratadas com PBS caseína durante 1 hora à temperatura ambiente. Em seguida, as placas foram lavadas novamente, de modo similar, e foram aplicados 100µL de solução de anti-soro monoclonal anti AFB₁ (sigma) na diluição 1:5000 por cavidade. Após duas horas em temperatura ambiente e posterior lavagem das placas, foram aplicados, em cada cavidade, 100µL do conjugado fosfatase- anti-IgG de camundongo, diluída 1:3000 em PBS-T. Incubou-se novamente por duas horas em temperatura ambiente. Após a lavagem final, foram adicionados 100µL da solução do substrato, p-nitrofenol fosfato (1mg/mL) e a reação foi determinada pela leitura de absorbância a 405 nm.

Ajustes de diluições ótimas dos extratos

Foram utilizadas cinco diluições de cada extrato (1:5, 1:10, 1:20; 1:40 e 1:80) em tampão de carbonato de sódio, em duplicatas, como antígenos para sensibilização das placas Elisa e condução das reações como descrito acima.

Ajustes de concentrações ótimas dos reagentes e limite de detecção de AFB₁

As concentrações de AFB₁: 1, 5, 10, 15, 20, 20, 25, 50, 200, 200, 400 e 800 µg kg⁻¹ preparadas com AFB₁ padrão (sigma) foram

avaliadas como antígeno no teste *Elisa indireto* em combinação com as seguintes concentrações de anti-soro anti AFB₁: diluições 1:2500, 15000, 1:10000, 1:20000; 1:30000; 1:40000 e 1:50000. As reações foram conduzidas como descrito no teste *Elisa indireto*.

Estimativa das concentrações de AFB₁ nos extratos

A curva padrão para se estimar as concentrações de AFB₁ foi feita a partir da preparação de sete concentrações de aflatoxina B₁ pura (sigma). São elas: 0, 5, 10, 20, 80, 160 e 320 µg kg⁻¹. Essas soluções foram utilizadas para sensibilização das placas Elisa, de acordo com o procedimento já descrito para o teste de *Elisa indireto*. Houve análise de nove repetições de cada amostra. As leituras obtidas foram utilizadas para cálculo e ajuste da curva padrão.

Resultados e Discussão

Nos ensaios preliminares para o ajuste de concentrações ótimas dos reagentes puros, antígenos e anticorpos para o teste *Elisa indireto não competitivo*, foram utilizadas 12 concentrações do antígeno AFB₁ (0 a 800 µg kg⁻¹) combinadas com 8 concentrações do antissoro anti-AFB₁ (diluição 1:2500 a 1:50000).

De acordo os resultados, Figura 1, observaram-se reações positivas em todos os casos, independente das concentrações do antígeno (AFB₁) e do anticorpo (As), indicando a diluição do As de 1:5000 como a mais adequada para os bioensaios de biossíntese e de quantificação da produção de AFB₁. Os resultados destes testes indicaram, ainda, um limite de detecção abaixo de 5,0 µg kg⁻¹, independente das diluições do antissoro avaliadas. Quando se utilizaram as diluições abaixo de 1:20000, o limite de detecção foi ainda menor, de 1,0 µg kg⁻¹. Este fato, alta sensibilidade, demonstra o potencial deste

método para o monitoramento da produção de AFB₁, considerando-se o nível de tolerância no Brasil entre 20 e 30 µg kg⁻¹. Esses resultados são próximos aos de WANG et al. (2006), que relatam limite de detecção de até 1,0 µg kg⁻¹ em grãos utilizando o teste *Elisa competitivo*.

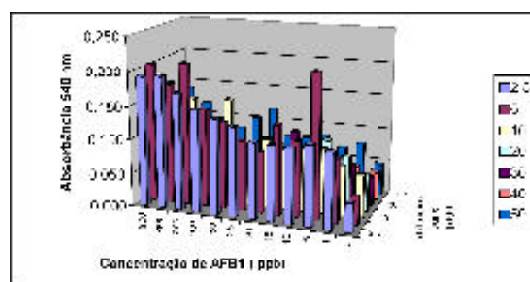


Figura 1. Limites de detecção de aflatoxina B₁ determinados através do teste Elisa indireto não competitivo, utilizando-se reagentes puros, aflatoxina B₁ e antissoro anti-aflatoxina B₁ em diferentes concentrações

A produção de AFB₁ detectada nos quatro substratos testados, apresentada na Figura 2, foi estimada através da equação $Y = 0,1343 * (1 - \exp(0,006128 * X))$, ($R^2 = 0,9513^{**}$). Ajustou-se a equação através da otimização não-linear, com minimização de erros usando mínimos quadrados, utilizando-se o programa Ky plot, versão 2.0. Notaram-se diferenças significativas entre os valores observados para a biossíntese de AFB₁ entre as amostras em função do tipo de grãos utilizado. Foram detectadas as concentrações de AFB₁ de 485,9 µg kg⁻¹ em sorgo, 55,2 µg kg⁻¹ em milho, 52,4 µg kg⁻¹ em arroz e 243,0 µg kg⁻¹ em meio de cultura líquido. A menor quantidade de AFB₁, detectada em arroz e em milho, demonstra que a presença do fungo não implica necessariamente em alta produção de AFB₁, considerando-se que se observou crescimento acentuado do fungo também nestas amostras.

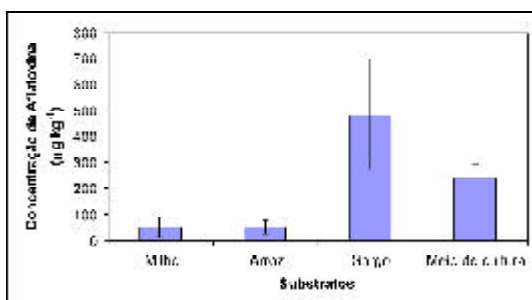


Figura 2. Biossíntese e quantificação de aflatoxina B₁ em cereais e em meio de cultura líquido inoculados com *Aspergillus Flavus*, detectada através do teste Elisa indireto não competitivo após 12 dias de incubação à temperatura ambiente. Valores médios de quatro repetições

Vale ressaltar que o valor encontrado de aflatoxinas em meio de cultura pode estar subestimado. Pois, neste caso, considerou-se somente AFB₁ extracelular, isto é, a quantificada no meio de cultura e não a acumulada na massa micelial do fungo. Sabe-se que a produção de aflatoxina micelial pode superar a encontrada em meio de cultura (CHUNG et al., 1989). Pode-se especular que a produção de AFB₁ observada depende do isolado de fungo testado, uma vez que a produção de esterigmatocistina (precursor da AFB₁) difere entre isolados de dois fungos em até 10 vezes (CHUNG et al., 1989).

Observou-se ainda, em alguns casos, uma variação elevada entre repetições a cada amostra, reveladas pelos desvios padrões das médias (Figura 1). No caso de meio de cultura ocorreu a menor variação, em torno de 21%, se comparada aos valores observados nas demais amostras, em que se observaram variações de 43, 50 e 75% para o desvio padrão das médias em sorgo, milho e arroz, respectivamente. Esses fatos evidenciam uma distribuição heterogênea de AFB₁ em grãos, o que implica em cuidados especiais com a amostragem destes materiais para análises desta natureza. Por essa razão, amostragens em análise de aflatoxinas em grãos têm

recebido atenção em diferentes pesquisas (WHITAKER & DICKENS, 1979; GILBERT & VARGAS, 2003).

Em razão da simplicidade, da sensibilidade e da rapidez do método avaliado, os resultados demonstram que o teste Elisa indireto não competitivo pode ser utilizado para a quantificação de AFB₁ em cereais, permitindo análises de grande parte de amostras com custos baixos. Entretanto, para uso rotineiro desse teste, torna-se essencial e crítica a sua validação de acordo com a demanda de cada laboratório, em função da natureza e dos tipos de amostras a serem analisadas, conforme comentado em outras pesquisas (GILBERTO & ANKLAM, 2002; ZHENG et al., 2005).

Conclusões

1. Em razão da sua simplicidade e da rapidez em relação aos demais métodos disponíveis, os resultados demonstram que o teste Elisa indireto não competitivo pode ser utilizado rotineiramente para a quantificação de AFB₁ em cereais, permitindo análises de grande parte de amostras com custos baixos.
2. Recomenda-se utilizar o antissoro anti AFB₁ na diluição de 1:5000, embora seja possível o uso de diluição de até 1:20 000.
3. O limite de detecção observado situou-se abaixo de 5,0 ppb de aflatoxina B₁ nas amostras analisadas, demonstrando que o método Elisa indireto não competitivo apresenta sensibilidade adequada para análises de AFB₁.
4. Os grãos de sorgo inoculados com *Aspergillus Flavus* favorecem a biossíntese de AFB₁ em relação aos de grãos de milho e de arroz.

5. A produção de AFB₁ em cereais inoculados com *Aspergillus flavus* depende do tipo de grão.

Referências

- CALDAS, E. D.; SILVA, S. C.; OLIVEIRA, J. N.. Aflatoxinas e ocratoxina A em alimentos e riscos para a saúde humana. *Revista de Saúde Pública, São Paulo*, v. 36, p. 319-323, 2002.
- CHEEKE, P. R.; SHULL, L. R. Mycotoxins. In: CHEEKE, P. R. Natural toxicants in feeds and poisonous plants. Westport: Avi, 1985. Cap. 12, p. 393-477.
- CHU F. S. Recent studies on immunoassays for mycotoxin. In: BEIER R. C.; STANKER, L. H. (Ed.). Immunoassays for residue analysis. Washington, DC: American Chemical Society, 1998. P. 294-313.
- CHUNG D.; ABOUZIED M. M.; PESTKA J. J.. Immunochemical assay applied to mycotoxin biosynthesis: Elisa comparison of sterigmatocystin production by *Aspergillus versicolor* and *Aspergillus nidulans*. *Mycopathologia, The Hague*, v. 107, p. 93-100, 1989.
- COUNCIL FOR AGRICULTURAL SCIENCE AND TECHNOLOGY. Mycotoxins: risks in plant, animal and human systems. Ames, 2003. 199 p. (Task Force Report, 139).
- DUTTON M. F. Enzyme and aflatoxin biosynthesis. *Microbiological Reviews*, Washington, v. 52, p. 274-295, 1988.
- FONSECA, H. Envenenamento Alimentar- Micotoxinas e Micotoxicoses. In: CAMARGO, R.; FONSECA, H.; GRANER, M.; PRADO, L. G. F.; CARUSO, J. G. B.; ANDRADE, M. O.; NOGUEIRA, J. N.; CANTARELLI, P. R.; LIMA, U. A.; OLIVEIRA, A. J.; MOREIRA, L. S. Tecnologia dos produtos agropecuários - Alimentos. São Paulo: Nobel, 1984. p. 51-57.
- GILBERT J.; ANKLAM, E. Validation of analytical methods for determining mycotoxins in foodstuffs. *Trends in Analytical Chemistry, Amsterdam*, v. 21, p. 468-486, 2002.
- GILBERT J.; VARGAS, E. A.. Advances in Sampling and Analysis for Aflatoxins and Animal Feed. *Journal of Toxicology-Toxin Reviews, New York*, v. 22 p. 381-422, 2003.
- JELINEK, C. F. Distribution of mycotoxins na analysis of world wide commodities data, including data from FAO/WHO/UNEP food contamination monitoring programme. In: FAO/WHO/UNEP INTERNATIONAL CONFERENCE ON MYCOTOXINS, 2., 1987, Bangkok. *Mycotoxins, 1987*: report. Rome: FAO, 1988.
- MALLMAN, C. A.; SANTURIO, J. M.; WENTS, L. Aflatoxinas - Aspectos Clínicos e Toxicológicos em Suínos. *Ciência Rural, Santa Maria*, v. 24, n. 3, p. 635-643, 1994.
- MARTINS, J. L. S.; MARTINS, I. S. Aflatoxin M₁ in B-type milk sold in S.Paulo city, Brazil. *Revista de Saúde Pública, São Paulo*, v. 20, n. 4, p. 303-308, 1986.
- PRADO, G.; PINTO, N. J. A.; OLIVEIRA, M. S. Incidência de aflatoxina em milho (*Zea mays* L.) com diferentes níveis de umidade, após tratamento com fungicida, armazenado em atmosfera com e sem aeração. *Revista do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo*, v. 55, n. 2, p. 79-84, 1995.

RAMAKRISHNA, N.; MEHAN, V. K. Direct and indirect competitive monoclonal antibody-based ELISA of Aflatoxin B₁ in groundnut. *Mycotoxin Research*, Mainz, v. 9, n. 1, p. 53-63, 1993.

SANTOS, J. L.; RIBEIRO, M. F. B.; SILVA, J. C. P. Aflatoxicose em suíno: ocorrência de surtos na Zona da Mata de Minas. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, Belo Horizonte, v. 38, n. 2, p. 167-172, 1986.

SCANLAN F. P. Why rapid testing? In: AMERONGEN, A. van; BARUG, D.; LAUWAARS, M. (Ed.). *Rapid methods for biological, chemical contaminants in food and feed*. Wageningen: Academic Publishers, 2005. p. 19-29, 2005.

SMITH, J.E.; ROSS, K. The toxigenic *Aspergilli*. In: SMITH, J. E.; ANDERSON, R. S. *Mycotoxins and animal foods*. Boca Raton: CRC Press, 1991. cap. 5, p.101-118.

EGMOND, H. P. van; JONKER, M. A. *Worldwide Regulations for Mycotoxins in Food and Feed in 2003*. Rome: FAO, 2004.

WANG, Y. P.; JI, R.; JIANG, T.; KANG, W. J. Development of ELISA -kit of quantitative analysis for Zearalenone. *Journal of Hygiene Research*, v. 35, n. 2, p. 221-224, 2006.

WHITAKER T. B.; DICKENS, J. W. *Variability Associated with Testing Corn for Aflatoxin*. *Journal of Association of Official Analytical Chemists*, Arlington, v. 56, p. 789-794, 1979.

WILLIAMS, P. C. Storage of grains and seeds. In: SMITH, J. E.; HENDERSON, R. S.. *Mycotoxins and animal foods*. Boca Raton, CRC Press, 1991. Cap. 30, p.721-746.

ZHENG, M.Z.; RICHARD, J. L.; BINDER J. A review of rapid methods for the analysis of mycotoxins. *Mycopathologia*, The Hague, v. 161, p. 261-273, 2006.

ZHENG, Z.; HUMPHREY, C. W.; KING, T. S.; TICHARD, J. L. Validation of an ELISA test Kit for the detection of total Aflatoxins in grain and grain products. *Mycopathologia*, The Hague, v.159, p. 255-263, 2005.

Comunicado Técnico, 152



Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:

Embrapa Milho e Sorgo

Endereço: Rod. MG 424 Km 45 Caixa Postal 151

CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG

Fone: (31) 3779 1000

Fax: (31) 3779 1088

E-mail: sac@cnpmis.embrapa.br

1ª edição

1ª impressão (2007): 200 exemplares

Comitê de publicações

Presidente: Antônio Álvaro Corsetti Purcino

Secretária-Executiva: Paulo César Magalhães

Membros: Camilo de Lélis Teixeira de Andrade, Carlos Roberto Casela, Flávia França Teixeira, José Hamilton Ramalho, Jurandir Vieira Magalhães

Expediente

Revisão de texto: Clenio Araujo

Editoração eletrônica: Tânia Mara Assunção Barbosa